



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos



José Lucas Ferreira Marques Galvão

**Estudo da atividade antibacteriana do isoeugenol contra cepas clínicas de
*Pseudomonas aeruginosa***

João Pessoa-PB
Fevereiro/2019

José Lucas Ferreira Marques Galvão

**Estudo da atividade antibacteriana do isoeugenol contra cepas clínicas de
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em **Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, na área de concentração **Farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa-PB

Fevereiro/201

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G182e Galvão, José Lucas Ferreira Marques.

Estudo da atividade antibacteriana do isoeugenol contra cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* / José Lucas Ferreira Marques Galvão. - João Pessoa, 2019.

72 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. *Pseudomonas aeruginosa*, Atividade antibacteriana. 2. Óleos essenciais, Fenilpropanóides, Isoeugenol. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

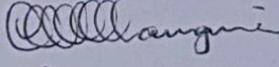


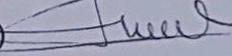
PgPNSB

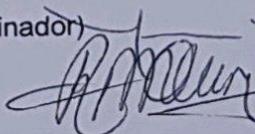
Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

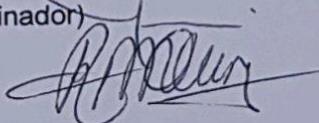
Ata da 403ª (quadringentésima terceira) Dissertação de Mestrado do aluno do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **José Lucas Ferreira Marques Galvão**, candidato ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

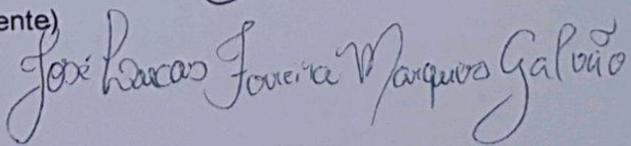
Às quatorze horas (14h00) do dia dezoito de fevereiro do ano de dois mil e dezoito (19/02/2019), nas dependências do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o aluno **José Lucas Ferreira Marques Galvão**, candidato ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Banca Examinadora os pesquisadores Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, Ph.D em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Reinaldo Nóbrega de Almeida, Ph.D em Farmacologia e Edeltrudes de Oliveira Lima, Ph.D em Farmácia. Sendo todos integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, a Presidente da Banca, professora Edeltrudes de Oliveira Lima, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o candidato **José Lucas Ferreira Marques Galvão**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Estudo da atividade antibacteriana do isoeugenol contra cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter)". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o candidato foi arguido pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADO**. Em face da aprovação, declarou a Presidente achar-se o examinado **José Lucas Ferreira Marques Galvão** legalmente habilitado a receber o Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o mesmo faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Caroline Helena Meireles de Medeiros Manguieira, na qualidade de Secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Caroline Helena Meireles de Medeiros Manguieira (Secretária) 

Prof.ª Dr.ª Edeltrudes de Oliveira Lima (Orientadora) 

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Examinador) 

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida (Examinador) 

José Lucas Ferreira Marques Galvão (Discente) 



José Lucas Ferreira Marques Galvão

**Estudo da atividade antibacteriana do isoeugenol contra cepas clínicas de
*Pseudomonas aeruginosa***

Aprovado em ___/___/___

Banca Examinadora

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

Orientadora

Prof. Dr. Reinaldo Nobrega de Almeida

Examinador Interno

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

Examinador Externo

João Pessoa-PB

Fevereiro/2019

"A coisa mais importante que se pode aprender é amar e em troca amado ser."

Moulin Rouge

Dedicatória

Aos meus pais, pelo carinho, amor e confiança
incondicional.

Aos meus irmãos José Guilherme e Aurélio Neto,
que sempre estiveram ao meu lado em todos os
momentos da minha vida.

A minha querida e amada Tia/Madrinha Gisélia, eu
sei que onde a senhora estiver, estará sempre
olhando por mim.

A minha inesquecível Tia Lena, essa vitória também
é parte sua.

Dedico.

Agradecimientos

A *Deus*, por ser minha fortaleza, proporcionando sabedoria, paciência e fé para alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, *Gilda* e *Rosalvo*, por nunca terem desistido de mim e por terem feito de tudo para que eu me tornasse o homem que sou hoje, sem nunca me desamparar ou faltar.

Aos meus dois irmãos, por estarem presentes em todos os momentos importantes da minha vida, a *José Guilherme*, companheiro para todos os momentos, de profissão, de filmes, de música, de vida e a *Aurélio* por ter estado comigo durante esses dois anos de mestrado e ter me proporcionado vários momentos diferentes durante toda essa jornada, seu momento vai chegar meu irmão e serei a pessoa mais feliz desse mundo.

Ao meu irmão de sangue, amigo-irmão, companheiro *Danilo Duarte*, que sempre esteve ao meu lado em todos os bons e ruins momentos da minha vida e que nunca me deixou faltar carinho, compreensão, amor, boas risadas e o principal Amizade. Obrigado mesmo do fundo do meu coração.

À minha querida orientadora *Edeltrudes de Oliveira Lima*, pela confiança, oportunidade e compreensão. És um exemplo de ser humano.

À minha querida irmã de profissão, de vida, de balada, de sorrisos, de tristeza, de amor, de companheirismo *Lyvia Layanne*, o quanto você é e sempre será importante para mim, Deus te colocou na minha vida não foi por acaso, tenho um anjo da guarda me protegendo sempre. Nossos caminhos foram mudados, mas mesmo tendo essa mudança o real sentido de tudo que vivemos desde 2011 continua: A **AMIZADE!!** Te amo Joseff e nossos laços serão eternos.

Aos *Topíssimos* (*Hidna, Lyvia, Fernando, Jessyca, Fiana, Renata e Filipe*) que me fizeram acreditar que realmente podemos construir amizades verdadeiras durante a graduação e que permanecem após. Que esse elo de amizade nunca se desfaça.

Aos meus amigos de escola e da vida *Junior e Fernando* que sempre estiveram presentes em todos os momentos de vitórias e conquistas na minha vida.

À minhas primas que amo de coração *Rita e Aninha* que me trazem alegria e felicidade e me mostram o verdadeiro sentido do amor entre os primos. Amo vocês minhas flores.

À minha Amada e querida GG, que bom tê-la ao meu lado novamente depois de tantos anos separados, uma felicidade única que fez o meu ano de 2018 ter o seu lado especial. Obrigado *Geovana* por todos os momentos, os cafés da tarde, os papos, as reflexões, os louvores, os conselhos de amiga e que amiga eu tenho! Te amo Paixão.

À minha Turma de Mestrado mais conhecida como *Turma Meteoro*, em especial aos vários anjos que cruzaram o meu caminho durante essa jornada: Ana Laura, Leuzinha, Anderson, Edvaldo, Rafa. Quero levar toda o carinho e a amizade de cada um de vocês para sempre comigo e desejar todo o sucesso desse mundo, vocês merecem a conquista que obtiveram nesse Doutorado e desse lado aqui eu vou estar sempre orgulhoso de vocês. Amo cada um.

À minha querida professora e amiga *Mariana Vieira Sobral*, obrigado minha flor por ter me ensinado muitas coisas durante esses dois anos e o principal delas foi que eu poderia construir uma linda amizade com você. Desde o começo você me surpreendeu com cada palavra, cada rizada, cada carinho nesses lindos momentos que passamos todos juntos (Topíssimos) e não foi à toa que você se tornou a Nona topíssima. Obrigado por tudo e pelas lindas palavras que recebi ao termino da seleção de Doutorado, isso jamais irei esquecer! Te Amo.

À *Hermes*, que me ajudou a realizar todos os experimentos sempre com muita paciência e boa vontade. Não teria conseguido sem você.

À *Daniele, Jeferson e Laísa* meus colegas de laboratório, por toda ajuda sempre que precisei. A *Laísa*, em especial, por ter entrado na nossa turma de mestrado como se fosse realmente da turma, um anjo, uma flor, que traz alegria as pessoas que estão

ao seu redor e tenho um carinho e admiração imensa por ti, te desejo todo sucesso do mundo.

À banca examinadora, Prof. Dr. *Reinaldo Nobrega de Almeida* e Prof. Dr. *Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes*. Meus sinceros agradecimentos por sua disponibilidade e pelo enriquecimento da realização desta tão sonhada conquista.

O *CNPQ* e a *UFPB* pelo apoio financeiro e institucional.

Muito obrigado!

Resumo

GALVÃO, J. L. F. M. Estudo da atividade antibacteriana do isoeugenol contra cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, 2019. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) CCS/UFPB, João Pessoa.

Evidências científicas ao longo do tempo, demonstram que *Pseudomonas aeruginosa* destaca-se dentre as bactérias gram negativas não fermentadoras que promovem elevadas taxas de morbidade, mortalidade e aumento de custos hospitalares em âmbito mundial. Este micro-organismo é intrinsecamente resistente à ampla diversidade de substâncias, sendo capaz de se tornar resistente a diversos agentes antimicrobianos. Atualmente, verifica-se uma significativa limitação do arsenal terapêutico que pode ser empregado para o tratamento de infecções causadas por esta bactéria multirresistente, uma vez que a *Pseudomonas aeruginosa* pode desenvolver seus mecanismos de resistência durante essa terapia. Portanto, baseado na resistência promovida por essa bactéria desperta-se a atenção dos pesquisadores a possibilidade do uso de compostos naturais, sendo estes, plantas medicinais e óleos essenciais e seus fitoconstituintes na prevenção ou tratamento de enfermidades, dentre esses fitoconstituintes destaca-se o isoeugenol, um fenilpropanóide. Diante disso, foi avaliada atividade antibacteriana do isoeugenol contra cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* por meio de ensaios realizados *in vitro*: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) e estudos de associação do isoeugenol com antimicrobianos convencionais (gentamicina e meropénem). Na avaliação da atividade antibacteriana foram utilizados duas cepas padrões e dez cepas de linhagem microbianas, o isoeugenol apresentou uma CIM de 64 µg/mL e uma CBM de 128 µg/mL, já para os antimicrobianos convencionais a gentamicina apresentou uma CIM de 1024 µg/mL e uma CBM >1024 µg/mL, enquanto que o meropénem teve sua CIM e sua CBM de 32 µg/mL. A associação do fenilpropanoíde primeiramente com a gentamicina mostrou-se tanto para a cepa padrão quanto para a cepa de linhagem microbiana 297 um efeito sinérgico, diferentemente foi observado que na associação do meropénem com a cepa padrão resultou-se um efeito de aditividade ou indiferença e para a cepa de linhagem microbiana 297 um efeito de antagonismo. Com isso, os resultados obtidos nesse estudo sugerem uma atividade antibacteriana do isoeugenol frente a cepas clínicas de *P. aeruginosa*, seja de forma isolada ou em associação com antimicrobiano padrão.

PALAVRAS-CHAVE: *Pseudomonas aeruginosa*, Atividade antibacteriana, Óleos essenciais, Fenilpropanóides, Isoeugenol.

Abstract

GALVÃO, J. L. F. M. Study of the antibacterial activity of isoeugenol against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, 2019. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) CCS/UFPB, João Pessoa.

Scientific evidence over time shows that *Pseudomonas aeruginosa* stands out among gram-negative, non-fermenting bacteria that promote high rates of morbidity, mortality and increased hospital costs worldwide. This microorganism is intrinsically resistant to the wide diversity of substances, being able to become resistant to several antimicrobial agents. There is now a significant limitation of the therapeutic arsenal that can be used to treat infections caused by this multiresistant bacterium, since *Pseudomonas aeruginosa* can develop resistance mechanisms during this therapy. Therefore, based on the resistance promoted by this bacterium, the researchers' attention is drawn to the possibility of the use of natural compounds, being these, medicinal plants and essential oils and their phytoconstituents in the prevention or treatment of diseases, among these phyto-constituents, , a phenylpropanoid. In this study, the antibacterial activity of isoeugenol against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated by means of in vitro assays: Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and studies of the association of isoeugenol with conventional antimicrobials (gentamicin and meropenem). In the evaluation of the antibacterial activity, two standard strains and ten strains of microbial strains were used, isoeugenol had a MIC of 64 µg / mL and a CBM of 128 µg / mL, whereas for conventional antimicrobials gentamicin had an MIC of 1024 µg / mL and a CBM > 1024 µg / mL, whereas meropenem had its MIC and MBC of 32 µg / mL. The combination of phenylpropanoid with gentamicin showed a synergistic effect for both the standard strain and the microbial strain 297, whereas it was observed that the association of meropenem with the standard strain resulted in an additive or indifference effect and for the strain of microbial strain 297 an antagonistic effect. Therefore, the results obtained in this study suggest an antibacterial activity of isoeugenol against clonal strains of *P. aeruginosa*, either alone or in combination with standard antimicrobial agents.

KEY WORDS: *Pseudomonas aeruginosa*, Antibacterial activity, Essential oils, Phenylpropanoids, Isoeugenol.

Lista de figuras

Figura 1: Macromorfologia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
Figura 2: Micromorfologia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Figura 3: Principais fatores de virulência em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gellatly e Hancock, 2013).....	31
Figura 3: Rotas metabólicas e formação dos compostos do metabolismo secundário.....	37
Figura 4: Possível mecanismo de ação dos óleos essenciais frente a bactérias.....	38
Figura 5: Estrutura do isoeugenol e eugenol.....	40

Lista de tabelas

Tabela 1: Exemplos de mecanismos de resistência em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gellatly & Hancock, 2013).....	33
Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) do isoeugenol frente às cepas ATCC e clínicas de <i>P.aeruginosa</i>	51
Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da gentamicina frente às cepas ATCC e clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	53
Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do meropeném frente às cepas ATCC e clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	53
Tabela 5: Efeito da associação do isoeugenol mais a gentamicina em diferentes concentrações sobre cepas ATCC-9027 de <i>P. aeruginosa</i>	56
Tabela 6: Efeito da associação do isoeugenol mais o meropeném em diferentes concentrações sobre C.CL 297 de <i>P. aeruginosa</i>	56
Tabela 7: Efeito da associação do isoeugenol mais o meropeném em diferentes concentrações sobre cepas ATCC-9027 de <i>P. aeruginosa</i>	57
Tabela 8: Efeito da associação do isoeugenol mais o meropeném em diferentes concentrações sobre C.CL 297 de <i>P. aeruginosa</i>	58

Lista de quadros

Quadro 1: Infecções comuns causadas por <i>P. aeruginosa</i> e fatores de riscos das mesmas. Adaptado de Gellatly e Hancock, (2013).....	32
Quadro 2: Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e respectivos sítios anatômicos....	45
Quadro 3: Classificação da CIM.....	48
Quadro 4: Determinação do ICIF da associação entre isoeugenol e gentamicina contra cepas de <i>P. aeruginosa</i>	57
Quadro 5: Determinação do ICIF da associação entre isoeugenol e meropeném contra cepas de <i>P. aeruginosa</i>	58

Lista de abreviaturas

ABTS	[2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]
AN	Ágar nutriente
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima
DL ₅₀	Dose letal média
DPPH	1,1- difenil-2-picrilhidrazil
ESBL	Espectro estendido de beta-lactamase
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IRAS	Infecções Relacionadas com a Assistência a Saúde
L.M	Linhagem microbiana
OE	Óleo essencial
PBP _s	Proteínas ligadoras de Penicilinas
QS	<i>Quorum sensing</i>
T3SS	Sistema de secreção tipo 3
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
ZOI	Zona de inibição

Sumário

1 INTRODUÇÃO	24
2 REFERENCIAL TEÓRICO	28
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter, 1872)	30
2.2 Terapia e resistência bacteriana	32
2.3 Produtos naturais	35
2.4 Óleos essenciais	37
2.4.1 Isoeugenol	39
3 OBJETIVOS	42
3.1 Geral	44
3.2 Específicos	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Local de trabalho	44
4.2 Cepas bacterianas	45
4.3 Inóculo	46
4.4 Meios de cultura	46
4.5 Fitoconstituente	47
4.6 Avaliação da atividade antibacteriana	47
4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	47
4.6.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	48
4.7. Ensaio de associação através do método checkerboard	49
4.8 Análise estatística	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM)	51
5.2 Ensaio de associação através do método checkerboard	55
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	62
ANEXO	72

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo os micro-organismos, tais como as bactérias, tem contato com uma imensa diversidade de produtos químicos e agentes antimicrobianos naturais presentes no ambiente. Dessa forma, sua realidade evolutiva reflete o aparecimento da resistência aos antimicrobianos como um fator de sobrevivência devido ao seu uso inadequado na prática clínica (FERNADES, 2006; MARTINEZ, 2009).

Nesse desempenho clínico destaca-se tanto a prática na comunidade como no ambiente hospitalar, para o combate as diversas infecções causadas por várias espécies bacterianas, essas atualmente conhecida como Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS).

As IRAs representam um dos eventos adversos mais frequentes nos hospitais e são adquiridas após o internamento do indivíduo no ambiente hospitalar, cuja manifestação pode ocorrer durante a internação ou após a alta (OLIVEIRA et al., 2011). Dados epidemiológicos são fundamentais para aprimoramento da gestão nos serviços de saúde visando proporcionar a segurança do paciente (BARSANTI; WOELTJE, 2009; WAWRZYNIAK et al., 2010).

No Brasil estima-se que 5 a 15% dos pacientes hospitalizados adquiram IRAS, com destaque para infecções do trato urinário (35-45%), seguido de trato respiratório (15-25%), corrente sanguínea (10-20%) e sítio cirurgico (14-16%) (OLIVEIRA; KOVNER; SILVA, 2010; OLIVEIRA, et al., 2012; ANVISA, 2013a; ANVISA, 2013b). Essas infecções são comuns e relevantes devido à sua periodicidade, morbidade e mortalidade. Dentre os agentes etiológicos que induzem ao desenvolvimento destas infecções, *Pseudomonas aeruginosa* assume um papel de destaque em razão as elevadas prevalência e incidência (ALY; AL-MOUSA; AL-ASAR, 2008; OTT, et al., 2013)

P. aeruginosa pode ser encontrada em diversos tipos de locais, com destaque para os ambientes úmidos, mas poderá estar presente em plantas, solo e água. Essa espécie tem sido constantemente isolada em amostra clínicas e quando se trata de pacientes hospitalizados especialmente aqueles internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) pode ser considerada uma das espécies bacterianas não fermentativas mais predominantes entre as espécies clínicas, uma vez que essa bactéria apresenta uma fácil colonização nesses pacientes internados, em virtude à

exposição aos aparelhos auxiliares e instrumentos, bem como as mãos de profissionais da saúde e o uso de antimicrobianos de amplo espectro (SADIKOT, et al., 2005; LABARCA, et al; TSITSOPOULOS, et al., 2016).

As infecções hospitalares bacterianas, principalmente ocasionadas por bactérias Gram-negativas, se apresentam como uma grande ameaça devido à sua rápida disseminação de cepas resistentes aos antimicrobianos disponíveis para o tratamento desses pacientes (SOMMER, et al., 2013). O aparecimento de cepas resistentes de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos convencionais, seja por um processo natural ou acelerado por pressão seletiva, se apresenta como um assunto relevante na saúde pública em âmbito mundial, ordenando rápidas intervenções epidemiológicas, microbiológicas e terapêuticas (KOLEF, M. H, 2005; MARCHAIM, et al., 2007) Dentre essas intervenções destaca-se o uso racional de antimicrobianos, a melhora no controle dessas infecções e o investimento no desenvolvimento de novos fármacos (LIVERMORE, D. M; WOODFORD, N, 2000).

A busca conjunta por novas opções terapêuticas para combater essa resistência microbiana vem sendo prioridade na agenda de saúde mundial. No Brasil, fonte de inestimável biodiversidade, vários princípios ativos presentes em plantas e em alimentos podem ser considerados a base para terapias inovadoras e efetivas, em que a busca por antimicrobianos de origem natural com atividade sobre grande espectro de micro-organismos, podendo ser usados como alternativa aos antibióticos convencionais ou em combinação tem despertado o interesse da classe científica, sobretudo nas moléculas de origem vegetal, uma vez que essas possuem um grande potencial em sintetizar substâncias químicas com estruturas moleculares variadas (PRADEEPA, et al., 2014).

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias lipofílicas geralmente odoríferas e líquidas presentes em plantas, com tonalidade incolor ou ligeiramente amarelada, sendo raro encontrá-los coloridos definidos e geralmente constituídos por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (INTERNATIONAL STANDARD – ISO, 2013). Esses óleos têm atividade antibacteriana explicada pela possível aptidão de inibir o crescimento bacteriano através de mecanismos relacionados a danos tanto estruturais como funcionais à membrana citoplasmática das bactérias (BURT, 2004).

Desses compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais encontram-se os difenóis, sendo o eugenol (4-alil-1-hidroxi-2-metoxibenzeno) e seu isômero isoeugenol (2-metoxi-4-propenil-fenol) importantes constituintes dessa classe. (BAKKALI, et al., 2008; CUNHA; ROQUE; NOGUEIRA, 2012). O Isoeugenol (2-metoxi-4-propenil-fenol) é encontrado em várias especiarias e é usado como agente de armazenamento e aromatização, apresentando-se algumas atividades biológicas relacionadas como analgésica, anti-inflamatória, uma alta atividade antioxidante e antibacteriana (ZHANG, et al., 2017).

Diante disso, pode-se inferir que se faz necessário a realização de estudos que investiguem o potencial antibacteriano de fitoconstituintes frente cepas de importância clínicas, com o objetivo de avaliar seu nível de atividade, seja isoladamente ou em associação com outros fármacos antimicrobianos já utilizados, evitando sua inibição proveniente de mecanismos de resistência ou melhorando sua eficácia. Contudo, baseado na potência biológica dos fenilpropanóides, este trabalho de pesquisa propôs avaliar a atividade antibacteriana do isoeugenol contra dez cepas clínicas de *P. aeruginosa* e sua associação a dois antimicrobianos empregados na terapia antipseudomonas.

Referencial teórico

2 Referencial teórico

2.1 *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872)

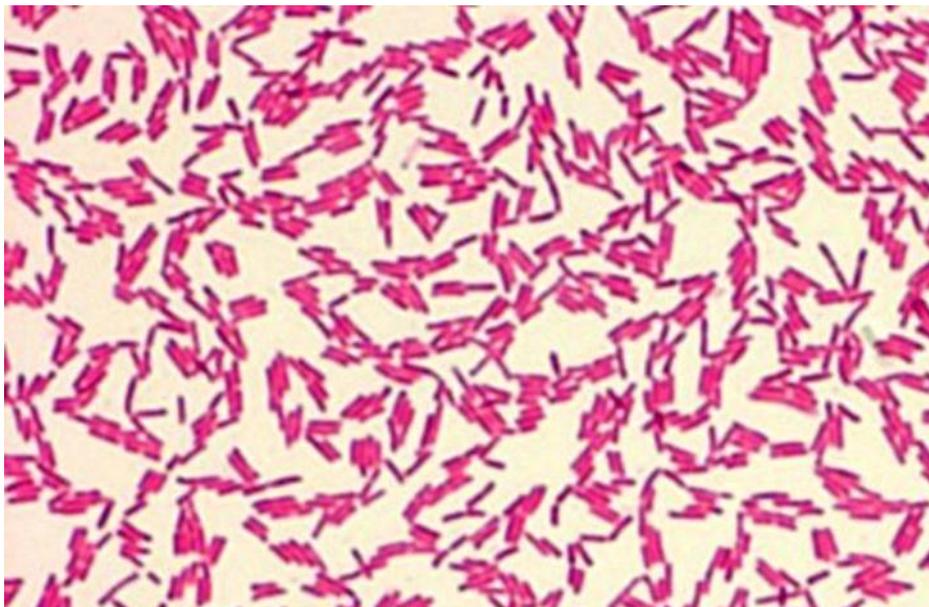
A bactéria é um bacilo Gram-negativo, do filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Pseudomonadales* e família *Pseudomonadaceae*. O seu comprimento varia entre 1,5 e 5 μm e a largura varia entre 0,5 e 1 μm . Este bacilo tem um flagelo polar que lhe confere mobilidade em superfícies líquidas e vivem em temperaturas entre os 4°C e os 42°C, sendo 37°C a temperatura ótima de crescimento. As culturas de *P. aeruginosa* têm o seu crescimento ótimo em condições aeróbias, mas também possuem a capacidade de se desenvolver em anaerobiose desde que exista uma fonte de carbono e um suplemento de nitrato (Figura 1 e 2) (LABAUVE; WARGO, 2012).

Figura 1: Macromorfologia de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: [www. Science Source](http://www.Science Source)

Figura 2: Micromorfologia de *Pseudomonas aeruginosa*.

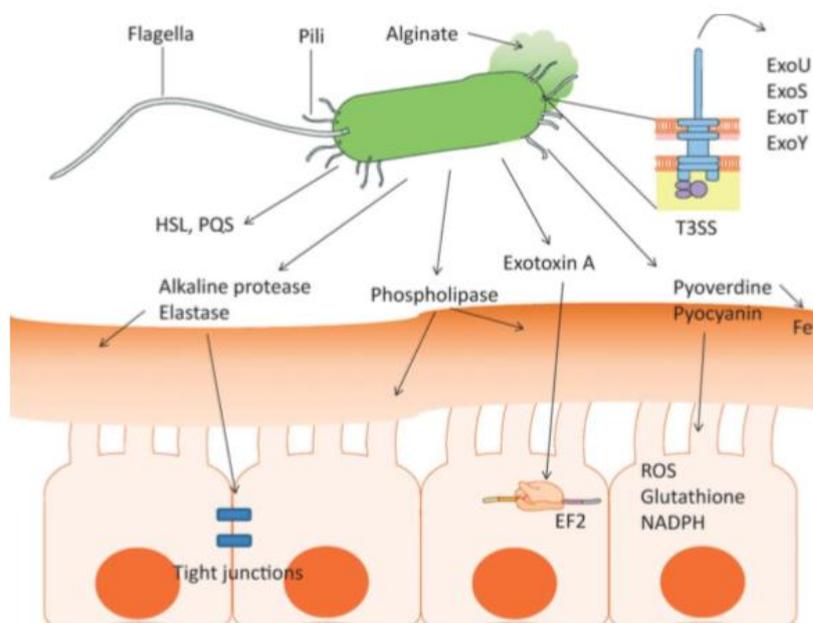


Fonte: www.microbiologyinpictures.com

A associação dos pigmentos piocianina com o pioverdina resulta na coloração esverdeada, característica comum à maioria das cepas de *P. aeruginosa*. É um micro-organismo indol-fenol oxidase, arginina di-hidrolase e catalase positivas e lisina e ornitina descarboxilase negativas (BERNARDO, 2009).

É comumente encontrada no solo, na água e em ambientes úmidos (GOMILA et al., 2013) e o principal sítio de colonização e reservatório da *P. aeruginosa* no homem é o trato gastrointestinal, podendo ser encontrada também em outros locais úmidos do corpo, como orofaringe, mucosa nasal, axilas e períneo (KIPNIS et al., 2006). Esta bactéria produz um elevado número de fatores de virulência que contribuem para sua patogênese, destacando-se especialmente: flagelos, *pili* ou fímbrias, lipopolissacarídeo, mecanismo *quorum sensing* (QS), biofilme, sistema de secreção tipo 3 (T3SS). Outros diversos fatores de virulência também são secretados por *P. aeruginosa*, como: proteases, lipases, fosfolipases, piocianina (Figura 3) que associados à sua elevada taxa de resistência aos antimicrobianos, são os principais fatores que dificultam a erradicação deste patógeno nos tecidos infectados, culminando em altos índices de mortalidade (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; MARCHAIM, et al., 2007; BERNARDO, 2009)

Figura 3: Principais fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* (Gellatly e Hancock, 2013).



Em relação ao tipo de infecção ocasionada por *P. aeruginosa*, aguda ou crônica, seu fenótipo difere (SMITH, et al., 2006). Nas infecções agudas esta bactéria expressa uma grande variedade de fatores de virulência, contudo, em infecções crônicas esses fatores podem estar ausentes e apresentarem apenas, flagelos e pili (HOGARD; HEESEMANN, 2010). Além disso, a *P. aeruginosa* em infecções crônicas tende a formar biofilme e aumenta a produção do exopolissacarídeo alginato (SADIKOT, et al., 2005; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

Esse bacilo Gram-negativo está envolvido em doenças oportunistas, particularmente em imunocomprometidos, promovendo dermatites, infecções urinárias e uma grande variedade de infecções sistêmicas, principalmente em ambientes hospitalares (PEDROSA et al., 2014). Spencer (1996) classificou *P. aeruginosa* como a segunda bactéria patogênica mais frequente na Europa e segundo Kanj et al. (2012) é o quinto agente patogênico mais frequente a nível mundial. Esta bactéria patogênica está associada à infecções adquiridas por pacientes hospitalares com suporte ventilatório ou cateterizados sendo causadora de infecções do aparelho respiratório (responsável por 30% das pneumonias), urinário (responsável por 19%

das infecções), em casos de queimaduras e em pacientes com fibrose cística podendo ser fatal (FOLKESSON et al. 2012; MICEK et al. 2015).

P. aeruginosa não surge exclusivamente em ambientes hospitalares e em indivíduos imunocomprometidos. Avalia-se que seja responsável por 7% das pneumonias comunitárias (LISTER, et al. 2009), 90% das endocardites em toxicod dependentes que utilizam drogas por via intravenosa (MENA; GERBA, 2009; KANJ; SEXTON, 2012) e 70% das otites e foliculites adquiridas pelo contato primário em balneários (KERR; SNELLING, 2009; MENA; GERBA, 2009). Isso ocorre devido sua elevada versatilidade metabólica que lhe conferem a capacidade de colonizar e crescer nos mais variados ambientes (Quadro 1).

Quadro 1: Infecções comuns causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e fatores de riscos das mesmas. Adaptado de Gellatly e Hancock, (2013).

Infecção	Principais fatores de riscos
Tecidos moles	Queimaduras, ferimentos não cicatrizados, pós cirurgia
Trato urinário	Uso de cateteres
Bacteremia	Imunocomprometimento
Pé diabético	Diabetes, circulação microvascular debilitada
Trato respiratório	Idade avançada, doença pulmonar crônica obstrutiva, fibrose cística, ventilação mecânica
Otite externa	Ferimento do tecido, bloqueio da água no canal do ouvido
Queratites (infecção da córnea)	Uso prolongado de lentes de contato, contaminação da solução de lentes de contato
Otite por meio da foliculite	Má manutenção e limpeza de banheiras

P. aeruginosa tem emergido como uma bactéria clinicamente relevante devido ao aumento do número de infecções produzidas por este micro-organismo e a propagação mundial de cepas com resistência a várias classes de antibióticos (LONG, et al., 2013; CHATTERJEE; OTTO, 2013).

2.2 Terapia e resistência bacteriana

Em relação a opções terapêuticas utilizadas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* incluem os aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, netilmicina e amicacina); as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) e as polimixinas. Entre os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos estão às penicilinas (ticarcilina e piperacilina), incluindo suas respectivas associações com inibidores de

β -lactamases (ácido clavulânico e tazobactam); as cefalosporinas de amplo espectro (ceftazidima, cefepima e cefoperazona); os carbapênens (imipenem, meropenem e doripenem) e o monobactam aztreonam (ZAVASCHI et al., 2010).

Mesmo contendo esse arsenal terapêutico essas bactérias podem desenvolver uma resistência a múltiplas classes de antibióticos e é hábil para aquisição de uma resistência adaptável durante um curso terapêutico, portanto, as infecções causadas por esta bactéria apresentam uma relevante gravidade (JUAN; OLIVER, 2010). Os mecanismos conhecidos de resistência aos antibióticos podem ser exibidos por esta bactéria (intrínseco, adquirido e adaptativo) (Tabela 1) e as taxas de resistência aumentam gradativamente, apesar do uso de terapias de combinação de drogas (MOORE; FLAWS, 2011).

Tabela 1: Exemplos de mecanismos de resistência em *Pseudomonas aeruginosa* (Gellatly e Hancock, 2013).

Mecanismo	Tipo de resistência	Exemplo (s)
Bombas de efluxo	Intrínseca	MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM (cefalosporinas, carbapenemes, aminoglicosídeos, quinolonas)
Impermeabilidade da membrana externa	Intrínseca	OprF, OprD, OprB (carbapenemes, aminoglicosídeos, quinolonas)
β -lactamases	Intrínseca	AmpC (penicilinas)
Mutações direcionadas	Adquirida	DNA girase, DNA topoisomerase (quinolonas) MexZ (quinolonas, cefapimes, aminoglicosídeos)
Transferência horizontal	Adquirida	Metallo- β -lactamases, ESBLs (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes)
Alterações membranares	Adaptativa	Modificação do lípido A (aminoglicosídeos, polimixinas) Regulação positiva AmpC (penicilinas)

A resistência intrínseca é codificada no cromossomo do micro-organismo. No caso da *P. aeruginosa*, esta resistência é devido à baixa permeabilidade da sua membrana externa, a superexpressão de bombas de efluxo de membrana, e a presença de β -lactamase, AmpC (STRATEVA; YORDANOV, 2009). Resistência

adquirida pode ser resultante da transferência genética ou de mutações, incluindo os genes reguladores, que estabilizam ou melhoram os mecanismos de resistência intrínseca. Elementos do DNA, como plasmídeos e transposons, podem ser transcritos entre as bactérias por conjugação, transformação, ou transdução e podem conferir resistência a um ou mais antibióticos. Estes elementos também podem intensificar a resistência intrínseca da *P. aeruginosa* e a resistência adaptável ocorre quando as condições ambientais, tais como: exposição a concentrações subinibitórias de antibióticos, ou estados de crescimento (formação de biofilme) promovendo um aumento da resistência (BREIDENSTEIN; DE LA FUENTE-NUÑEZ; HANCOCK, 2011).

Um mecanismo bem complexo que contribui para o fenótipo de resistência observado em amostras de *P. aeruginosa* são os sistemas de efluxo que possuem grande importância microbiológica por serem codificados por genes cromossômicos e por possuírem uma ampla variedade de substratos, podendo exportar do interior da célula compostos estruturalmente distintos, promovendo resistência à classe não relacionadas de antimicrobianos (SHAIKH, 2015).

Em relação à resistência adquiridos aos β -lactâmicos destaca-se três principais mecanismos: redução da acumulação intracelular dessas drogas, pela perda e/ou expressão reduzida das proteínas de membrana externa ou hiperexpressão do sistema de efluxos; modificações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) sítio-alvo desses agentes; e alteração enzimática dos antimicrobianos, pela produção de β -lactamases (STRATEVA; YORDANOV, 2009)

Além de suas propriedades antibacterianas intrínsecas, produtos naturais e seus derivados podem alterar o efeito dos antimicrobianos, seja aumentando a atividade antimicrobiana ou revertendo à resistência aos antimicrobianos convencionais. A utilização destas substâncias pode representar um avanço contra os mecanismos de resistência desenvolvidos pelos micro-organismos que inativam antibióticos (CASTRO, 2010).

De acordo com Yim et al. (2011) a combinação de antimicrobianos com imipenem pode proporcionar uma opção de tratamento para infecções complicadas ocasionadas por Enterobacteriaceae produtoras de ESBL ou AmpC e que, a combinação de antimicrobianos pode reduzir o surgimento de resistência e elevar o espectro de atividade.

Então, o estudo e a descoberta de produtos naturais com princípios ativos que apresentem atividade antimicrobiana intrínseca ou combinada com antimicrobianos de uso comum podem representar uma nova forma de fazer frente aos micro-organismos multidroga resistentes (COUTINHO, 2008).

2.3 Produtos naturais

Os produtos naturais de origem vegetal são utilizados pelo homem desde os primórdios da civilização. A busca por alívio e cura das doenças por meio da utilização de folhas e ervas, tenha sido talvez, uma das primeiras formas da utilização das plantas medicinais. Atualmente caracteriza-se planta medicinal como toda planta que ao ser administrada ao homem ou animal, indiferentemente da via ou forma de utilização, exerce ação terapêutica, ou seja, possuem atividade biológica, com um ou mais princípios ativos úteis à saúde humana (LOPES; PANTOJA, 2013).

A crença popular de que as plantas auxiliavam no tratamento de doenças aos poucos foi sendo substituída pelo forte apelo ao uso de medicamentos, surgidos na década de 1930 e 1940. Onde, anteriormente usava-se uma gama de formulações para uma única doença, após o surgimento dos alopáticos passou a ter um medicamento para cada patologia, o apreço comercial fez com apesar da grande diversidade de flora medicinal brasileira, ocorresse uma diminuição de incentivos, utilização e descontinuidade do cultivo de plantas com propriedades farmacológicas (BRUNING et al., 2012).

Mesmo assim um dos aspectos que atualmente desperta a atenção dos pesquisadores é a possibilidade do uso de compostos naturais poderem contribuir para o desenvolvimento de resistência aos agentes antimicrobianos, em especial se utilizados de modo continuado (HAMMER et al. 2012; APOLÓNIO et al. 2014). Sendo assim no Brasil, a Floresta Amazônica, o Cerrado, a Mata Atlântica, o Pantanal, a Caatinga e o Manguezal são alguns dos distintos biomas brasileiros onde crescem cerca de 60 mil espécies vegetais (COSTA-LOTUFO et al., 2010) e que nos fornece diversos compostos bioativos podendo ser metabolitos primários ou metabolitos secundários de extrema importância científica, social, econômica, cultural e

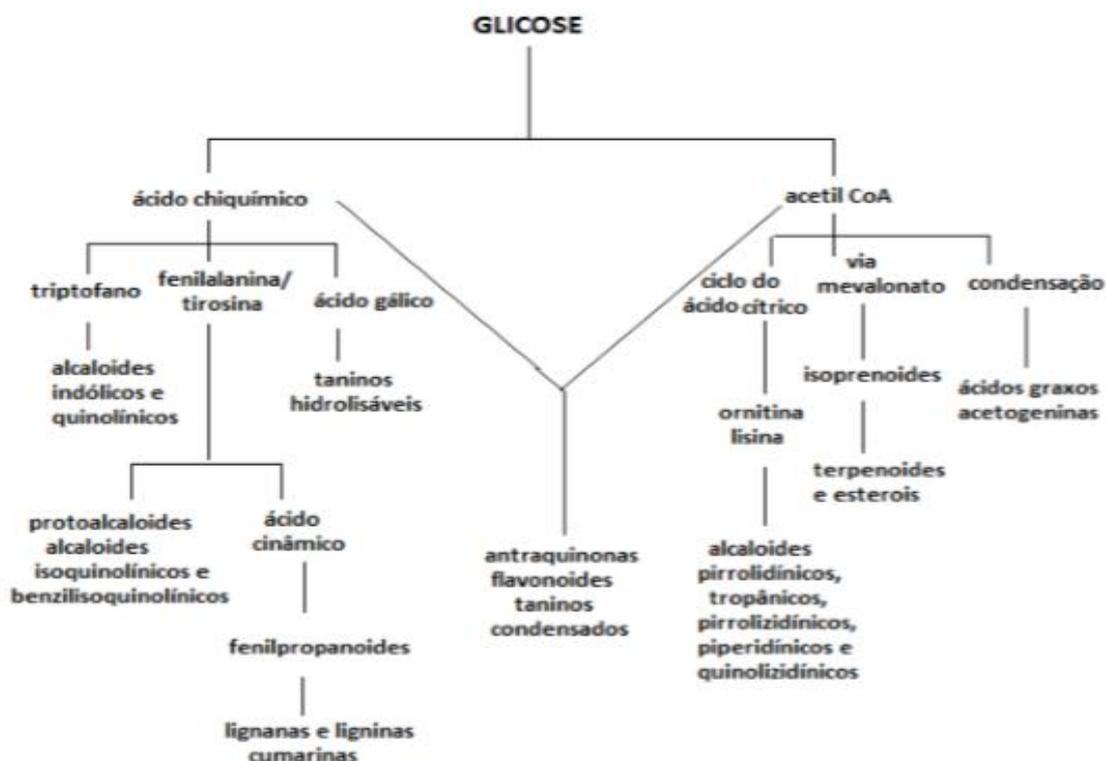
ambiental para a população e, principalmente para os pesquisadores brasileiros (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

O metabolismo das plantas depende fundamentalmente da sua fisiologia, podendo ser didaticamente dividido em primário e secundário. Atualmente, sabe-se que o metabolismo primário é considerado essencial a todas espécies de plantas, pois é responsável pelo desenvolvimento e também manutenção celular. Estando ligados nestes processos, carboidratos, lipídeos, clorofila, proteínas e ácidos nucléicos. Enquanto que o metabolismo secundário oferece vantagens a certas espécies, como forma de defesa as influências externas que a planta sofre em decorrência de ataques de insetos e polinizadores, além da defesa entre competição planta-planta, processos adaptativos perante o estresse hídrico e a deficiência de nutrientes (SIMÕES et al., 2007).

A origem de todos os metabólitos secundários ocorre a partir do metabolismo da glicose e visam primariamente a obtenção de nutrientes para a necessidade da célula, como energia, poder redutor e biossíntese de compostos essenciais à sobrevivência como lipídeos, proteínas, dentre outras. Tendo duas vias intermediárias principais, o ácido chiquímico e o acetato (GLOBBO-NETO; LOPES, 2007) (Figura 3).

Alguns metabólitos secundários são derivados não apenas de uma via intermediária, mas sim são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou ainda de derivados deste, como acontece no caso das antraquinonas, flavonóides e ainda dos taninos condensados (SIMÕES et al., 2007)

Figura 3: Rotas metabólicas e formação dos compostos do metabolismo secundário.



FONTE: Adaptado SIMÕES et al., 2007.

2.4 Óleos essenciais

Dentre os metabólitos secundários presente nas plantas com propriedades farmacológicas (SILVEIRA et al., 2012) destaca-se os óleos essenciais que são quimicamente constituídos por uma variedade de classes químicas os terpenóides e fenilpropanóides formando os principais constituintes dos óleos, além disso poucos constituintes aromáticos e alifáticos também compõem esses metabólitos secundários e os monoterpenos, sesquiterpenos e oxigenados formando o maior grupo de entidades químicas presentes nos óleos essenciais (RAUT; KARUPPAYIL, 2014) o seu método de extração varia, de acordo com a composição, a essência e a parte em que serão extraídos os óleos. Buscando-se nos frutos, flores, cascas, raízes ou ainda na planta inteira, empregando métodos como a hidrodestilação, destilação a vapor, CO₂ supercrítico, solventes orgânicos e enfloração. A obtenção deste valioso líquido, com inúmeras propriedades, que vêm sendo cada vez mais procurado pelas indústrias (BUSATO et al., 2014).

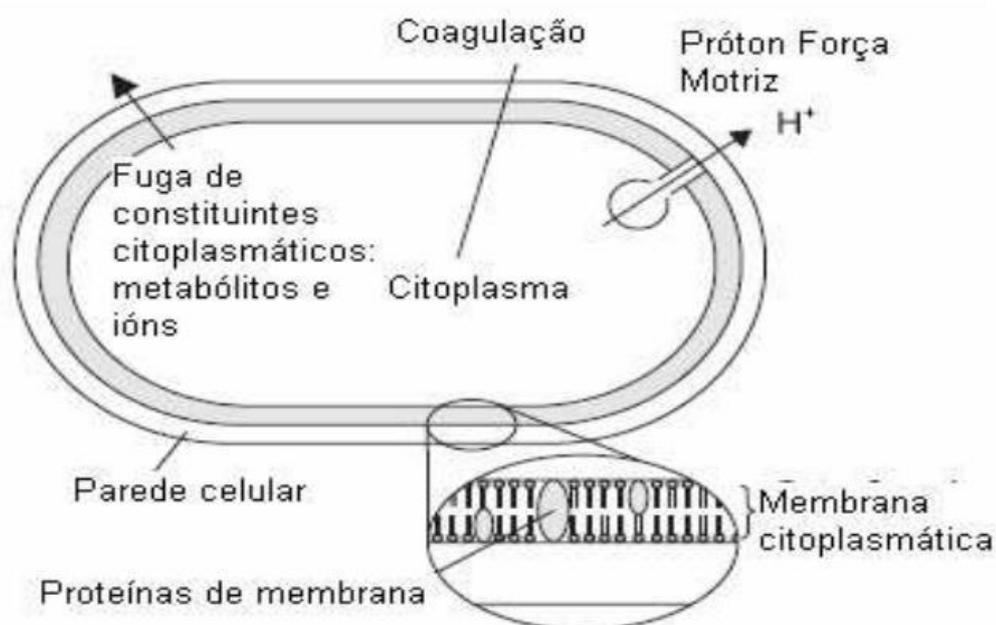
Em relação ao seu uso medicinal documenta-se com atividades anti-inflamatória, antisséptica, antioxidante (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013) ação

carminativa, antiespasmódica, estimulante sobre secreções do aparelho digestivo cardiovascular, irritante tópica ou revulsiva, secretolítica, sobre o sistema nervoso central (SNC), analgésica local, inseticida, antisséptica (inibindo crescimento de bactérias e fungos) (SARTO; ZANUSSO JUNIOR, 2014).

Os óleos essenciais tem sua atividade antibacteriana explicada pela possível aptidão de inibir o crescimento bacteriano através de mecanismos relacionados a danos tanto estruturais como funcionais à membrana citoplasmática das bactérias (Figura 4) (BURT, 2004).

Esses metabólitos secundários são geralmente lipofílicos, desta maneira, acabam acumulando-se na bicamada lipídica da membrana citoplasmática, gerando um aumento de permeabilidade ou ainda ter efeitos sinérgicos aos antibióticos (MOUSSAOUI; ALAOUI, 2016). Esta permeabilidade é dependente da composição e hidrofobicidade dos solutos que a permeiam, fazendo com que a resistência das bactérias frente aos óleos essenciais possivelmente esteja relacionada à habilidade de partição dos componentes do próprio óleo na fase lipídica da membrana (SEMENIUC et al., 2017).

Figura 4: Possível mecanismo de ação dos óleos essenciais frente a bactérias.



É importante destacar que, devido à variedade de componentes nos óleos essenciais, torna-se difícil atribuir o efeito antibacteriano a um deles, o que reforça a busca de estudos sobre os compostos majoritários dos óleos. Relata-se então que os fenóis que compõem esses óleos são compostos orgânicos caracterizados pela presença de uma hidroxila (OH) ligada a um anel aromático e os mais numerosos são os monofenóis, destacando-se o timol. (BAKKALI, et al., 2008).

Esses compostos normalmente apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como também possuem atividade contra biofilmes, mecanismo de virulência produzido por micro-organismos patogênicos resistentes a antibióticos, como por exemplo *P. aeruginosa* (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Tais substâncias podem alterar o efeito de fármacos antimicrobianos convencionais, seja aumentando ou diminuindo sua atividade. E a utilização dessas substâncias pode representar um avanço contra os mecanismos de resistência que inativam fármacos antimicrobianos (MIRON et al., 2014).

Na pesquisa vários trabalhos já direcionam seu foco para a avaliação da atividade antibacteriana de produtos de origem natural isoladamente e em associação a fármacos já utilizados contra cepas de *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Um horizonte de novos estudos e possibilidades promissoras na descoberta de novos tratamentos (SILVA, et al., 2015).

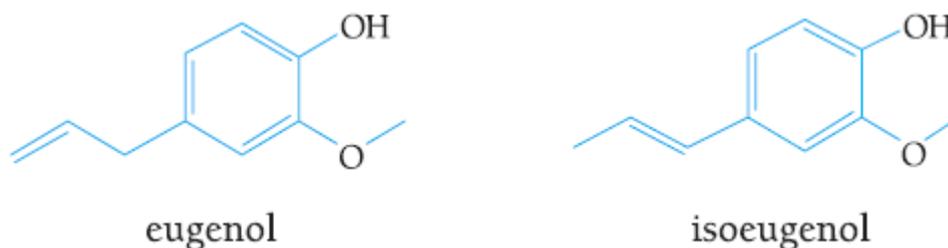
Com o aparecimento dos avanços tecnológicos é possível utilizar as substâncias ativas, isoladas das plantas como modelo para síntese de novos fármacos, e para a realização de modificações estruturais visando a otimização de suas propriedades e a descoberta de sua utilidade para o tratamento de infecções acometidas por bactérias (BRAZ FILHO, 2010).

2.4.1 Isoeugenol

Os difenóis são pouco frequentes, mas dentre eles destaca-se o eugenol (4-alil-1-hidroxi-2-metoxibenzeno) (BAKKALI, et al., 2008; CUNHA, et al., 2012). O Isoeugenol (2-metoxi-4-propenil-fenol) o isômero do eugenol é encontrado em várias especiarias e é usado como agente de armazenamento e aromatização, apresentando-se algumas atividades biológicas relacionadas como analgésica, anti-

inflamatória, uma alta atividade antioxidante e antibacteriana (Figura 5) (ZHANG, et al., 2017).

Figura 5: Estrutura do isoeugenol e eugenol.



Fonte: www. PubChem – NIH

Zhang et al. (2017) fez um estudo comparativo entre o eugenol e o isoeugenol e demonstrou algumas atividades biológicas dos mesmos frente estirpes de bactérias Gram-positivas e negativas. Dentre os testes realizados destacam-se a avaliação da atividade antibacteriana contra patógenos de origem alimentar, por meio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e avaliação da zona de inibição (AZI), atividade antioxidante mediante a realização dos ensaios de captura de radicais, como o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e o ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico)].

Em um estudo feito por Miyamoto e colaboradores foi visto que o constituinte isoeugenol apresentou uma excelente atividade antibacteriana frente a cepas clínicas de *Helicobacter pylori* e surpreendentemente foi observado essa mesma atividade sobre cepas resistentes à claritromicina e ao antifúngico metronidazol (MIYAMOTO; OKIMOTO; KUWAN, 2014).

O primeiro estudo que avaliou a atividade antibacteriana do isoeugenol inibindo a formação de biofilmes produzidos por *S.aureus*, *L. monocytogenes*, e *Pseudomonas fluorescens* foi realizado por (NIELSEN et al., 2017). Neste estudo foram revestidas com isoeugenol via adsorção física as superfícies de aço inoxidável e polietileno, e após a realizações dos testes foi observado que não houve detecção de bactérias vivas de *P. fluorescens*, *S. aureus*, e *L. monocytogenes* sobre as superfícies, mesmo após 24 h de incubação em meios nutrientes para permitir o crescimento bacteriano. Já em um estudo relacionado ao seu mecanismo de ação, Hyldgaard et al., (2015) mostra que tanto frente a bactérias Gram-negativa, como

Escherichia coli, e Gram-positiva, como *Listeria innocua*, em diferentes concentrações o isoeugenol teve seu efeito bactericida e bacteriostático, respectivamente.

No estudo de toxicidade destaca-se, na toxicidade aguda, a DL50 do isoeugenol que foi de 1.560 mg/kg de peso corporal, quando administrado em ratos por via oral (TAYLOR; JENNER; JONES, 1964). O consumo de 500 mg/kg de peso corporal na dieta de ratos machos e fêmeas, durante 16 semanas, não ocasionou mudanças no peso corporal, consumo de alimentos, avaliação hematológica ou peso dos órgãos (HAGAN et al., 1967).

Estudos de carcinogenicidade do isoeugenol foi realizado pelo Programa Nacional de Toxicologia (2010) dos Estados Unidos com ratos machos e camundongos de ambos os sexos. Foram administrando doses de isoeugenol a 75, 150 ou 300 mg/kg de peso corporal, presentes no óleo de milho por gavagem durante 2 anos, observou-se em ratos machos atividade raras ocorrências de aumento da incidência de timoma e carcinoma de glândula mamária, em ratos fêmeas, não houve evidência de atividade cancerígena do isoeugenol.

No ensaio de micronúcleo, realizado em camundongos machos administrando isoeugenol (37,5 a 600 mg/kg), por gavagem durante três meses, nas amostras de sangue periférico, não houve aumento da incidência de eritrócitos policromáticos micronucleados e eritrócitos normocromáticos micronucleados, indicando ausência de toxicidade relacionada à exposição à medula óssea (NTP, 2010).

O isoeugenol é uma molécula de valor comercial e devido a sua baixa toxicidade abordada na literatura e ao perfil ativo de várias propriedades farmacológicas, permite vislumbrar a análise potencial ao desenvolvimento de novos medicamentos com possível propriedade antimicrobiana.

Considerando a importância clínica e epidemiológica dispensada às infecções bacterianas por *P. aeruginosa*, assim como as dificuldades no seu tratamento e o aumento da resistência aos antimicrobianos, as investigações do presente estudo se mostram relevantes e torna-se necessário o estudo de novos fármacos naturais e/ou sintéticos com propriedade antibacteriana.

Objetivos

3 Objetivos

3.1 Geral

- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do fitoconstituente isoeugenol frente a dez cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*

3.2 Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fitoconstituente isoeugenol sobre duas cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) e isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do fitoconstituente isoeugenol sobre duas cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) e isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Avaliar a interferência do isoeugenol sobre a resistência aos antibióticos convencionais, gentamicina e meropeném, pelas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* através do método de checkerboard;

Material e métodos

4 Material e métodos

4.1 Local de trabalho

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. O trabalho em estudo foi aprovado pelo Comitê de Bioética de acordo com Resolução nº 466/12, sob o parecer de número 2.741.747 (Anexo A). Período: junho – novembro de 2018, pelo Comitê de Ética do CCS.

4.2 Cepas bacterianas

Foram utilizadas 12 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* para realização dos ensaios, sendo estas 2 cepas padrão (ATCC) e 10 cepas de origem clínica isoladas de diversos tipos de infecções codificadas como L.M: L.M-136, L.M-163, L.M-230, L.M-286, L.M-297, L.M-356, L.M-359, L.M-362, L.M-375 e L.M-410 (Quadro 2).

Quadro 2: Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e respectivos sítios anatômicos.

Micro-organismo	Origem das cepas
ATCC-9027	
ATCC-27853	
LM-136	Cultura Geral
LM-163	Secreção da Gastrostomia
LM-230	Secreção de Ouvido Esquerdo
LM-286	Secreção Nasal Direita
LM-297	Urocultura
LM-356	Urocultura
LM-359	Secreção da Gastrostomia

LM-362 LM-375 LM-410	Secreção Traqueal Cultura Geral Lesão do Pé Direito
---	---

FONTE: Autor, 2018.

Todas as linhagens bacterianas clínicas foram cedidas pela farmacêutica-bioquímica Darci de Magalhães Melo, obtidas através de linhagens clínicas do Laboratório de Patologia Clínica HEMATO, localizado em João Pessoa – PB. A cepa ATCC pertence à coleção da MICOTECA do Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. Dentre as linhagens que apresentaram a porcentagem estabelecida através da CIM, foram escolhidas as cepas ATCC-9027 e L.M-297 para realização do ensaio de associação.

As cepas foram mantidas no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), à temperatura de 4 °C, em meio Ágar Nutriente (AN) (DIFCO Laboratories/USA/France).

Para utilização nos ensaios, estas culturas foram descongeladas e reativadas através de repique em caldo Infusão Cérebro e Coração (Brain Heart Infusion – BHI) (DIFCO Laboratories/USA/France) durante 24 horas a 35 ± 2 °C. Os meios de cultura foram preparados conforme as instruções dos fabricantes.

4.3 Inóculo

Para preparação do inóculo, colônias obtidas de culturas recentes de *P.aeruginosa* mantidas em caldo BHI foram suspensas em solução estéril de cloreto de sódio (NaCl) 0,85%, e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 de McFarland, que corresponde à aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL) (CLEELAND; SQUIRES, 1991; NCCLS, 2000; HADACEK; GREEGER, 2000; NCCLS, 2002; ANTUNES et al., 2006; FREIRE et al., 2014).

4.4 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram: Ágar Nutriente (DIFCO Laboratories/USA/France), Infusão Cérebro e Coração (Brain Heart Infusion – BHI) (DIFCO Laboratories®/EUA/França), caldo Mueller-Hinton (Mueller-Hinton Broth - Oxoid®/Reino Unido), ágar Mueller-Hinton (Oxoid®/Reino Unido), os quais foram preparados conforme as descrições dos fabricantes.

4.5 Fitoconstituente

O fitoconstituente utilizado neste trabalho foi o fenilpropanóide isoeugenol (C₁₀H₁₂O₂) (Sigma-Aldrich®). Para utilização nos ensaios, este composto foi solubilizado em dimetil-sulfóxido (DMSO) numa proporção de até 10%, tween 80 a 0,02% e água destilada em quantidade suficiente para completar 3mL de emulsão em concentração 1024µg/mL (CEELAND; SQUIRES, 1991; NASCIMENTO et al., 2000). Os antibacterianos padrões utilizados nos ensaios como controle foram gentamicina e meropeném (Sigma-Aldrich®).

4.6 Avaliação da atividade antibacteriana

4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima do isoeugenol, da gentamicina e do meropeném foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, em duplicata, por meio de placas de 96 poços com fundo em forma de “U” (ALAMAR®) estéreis, conforme recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo Mueller-Hinton em cada orifício da placa. Em seguida, 100 µL da emulsão duplamente concentrada do fitoconstituente foram diluídos em série no meio de cultura, de modo que foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 2 µg/mL de isoeugenol, onde na primeira linha de cada coluna da placa se encontra a maior concentração do composto, e na última linha a menor. Por fim, foram adicionados 10 µL dos inóculos das suspensões bacterianas nas cavidades, de maneira que cada duas colunas da placa sejam correspondentes a uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Paralelamente, foram realizados controles com gentamicina e meropeném (1024 µg/mL até 2 µg/mL).

Além disso, também foram realizados controles de esterilidade do meio de cultura e do diluente (caldo BHI + DMSO) e de viabilidade das cepas ensaiadas (caldo BHI + inóculo).

Todos os ensaios foram realizados em duplicata e as placas foram fechadas e incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24h. O crescimento bacteriano foi indicado pela adição de 20 μL de solução de resazurina sódica em água destilada (Sigma-Aldrich®) a 0,01%. Após incubação à temperatura ambiente durante 1h, foi realizada a leitura. Bactérias viáveis reduziu o corante, mudando sua coloração do azul para rosa. A CIM foi determinada como a menor concentração da substância que inibiu a mudança de coloração da resazurina (SOUSA et al., 2010).

Os resultados foram expressos pela média aritmética das CIMs obtidas nos dois ensaios. A avaliação dos resultados obtidos será feita conforme análise de SARTORATTO et al., 2004 (Quadro 3), que propôs uma classificação do potencial antimicrobiano para produtos vegetais com base nos resultados da CIM, considerando como forte poder antimicrobiano os produtos com CIM até 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, moderado poder antimicrobiano aqueles com CIM entre 600 e 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e de fraco poder antimicrobiano os produtos com CIM acima de 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Quadro 3: Classificação da CIM.

Concentração	Classificação da Atividade
< 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Forte/Ótima
600-1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Moderada
< 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Fraca ou Produto Inativo

FONTE: Autor, 2018.

4.6.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Após a leitura da CIM, foram retiradas alíquotas de 10 μL dos sobrenadantes das cavidades a partir de onde não houver crescimento bacteriano visível até três diluições subsequentes (CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8) e semeadas na superfície do meio BHI. A leitura do resultado foi realizada após 48h de incubação a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A CBM foi considerada como a menor concentração do

fitoconstituente capaz de matar 99% do inóculo (crescimento inferior a 3 colônias bacterianas). Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado foi expresso pela média aritmética das CBMs obtidas (NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008; HAFIDH et al., 2011).

4.7. Ensaio de associação através do método *checkerboard*

O Método de Checkerboard é um teste de microdiluição que avalia a CIM de drogas sozinhas e combinadas. A partir do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF), são realizados os cálculos para avaliar se a associação resultou em sinergismo, antagonismo ou indiferença.

Para realização deste ensaio, 100µL de caldo BHI foram adicionados nos poços de microplacas estéreis contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” (Alamar®). Em seguida, 50 µL de diferentes concentrações ($CIM \div 16$, $CIM \div 8$, $CIM \div 4$, $CIM \div 2$, CIM, $CIM \times 2$, $CIM \times 4$ e $CIM \times 8$) do fitoconstituente isoeugenol e dos antibacterianos-padrões foi adicionados no sentido vertical (antibacterianos-padrões) e horizontal (fitoconstituente) da microplaca. Por fim, foi adicionado 10 µL da suspensão bacteriana. O ensaio foi realizado em duplicata, e as microplacas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24-48 horas (ELIOPOULOS; MOELLERING, 1991; DUTTA et al., 2004).

O ICIF foi calculado através da soma das concentrações inibitórias fracionadas (CIFs): $CIF_A + CIF_B$, em que A representa o fitoconstituente e B o antibacteriano-padrão. O CIF_A , por sua vez, é calculado através da relação CIM_A combinado/ CIM_A isolado, enquanto que o $CIF_B = CIM_B$ combinado/ CIM_B isolado (ODDS, 2003). Este índice é interpretado da seguinte forma: Sinergismo ($ICIF \leq 0,5$), Antagonismo ($ICIF > 4,0$), Indiferença ($0,5 < ICIF \leq 4$) (ODDS, 2003; SHIN, 2003).

4.8 Análise estatística

A análise dos resultados obtidos nos ensaios de CIM, CBM e estudo de associação foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) e analisados empregando-se o teste *t* de Student não pareado, para análise de duas colunas. Os resultados foram considerados significativos apenas quando $p < 0,05$ e para análise dos dados referentes aos resultados foi utilizado o software GraphPad Prism (versão 7.0 para Windows, San Diego, CA - EUA).

Resultados e discussão

5. Resultados e discussão

5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM)

Os resultados obtidos nos ensaios de avaliação da atividade antibacteriana do fitoconstituente isoeugenol contra cepas clínicas de *P. aeruginosa*, juntamente aos controles dos micro-organismo e esterilidade estão expressos na tabela 2.

Como pode ser observado, o isoeugenol foi capaz de inibir o crescimento das 12 cepas clínicas de *P. aeruginosa* testadas, obtendo uma CIM estabelecida em 64 µg/mL e uma CBM de 128 µg/mL (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) do isoeugenol frente às cepas ATCC e clínicas de *P.aeruginosa*.

Micro-organismo	Isoeugenol		Controles	
	CIM	CBM(µg/mL)	Micro-organismo	Esterilidade
ATCC-9027	64	128	+	-
ATCC-27853	64	128	+	-
LM-136	64	128	+	-
LM-163	64	128	+	-
LM-230	64	128	+	-
LM-286	64	128	+	-
LM-297	64	128	+	-
LM-356	64	128	+	-
LM-359	64	128	+	-
LM-362	64	128	+	-
LM-375	64	128	+	-
LM-410	64	128	+	-

+: presença de crescimento do micro-organismo; -: ausência de crescimento de micro-organismo
FONTE: Autor, 2018.

O isoeugenol pertence ao grupo dos fenilpropanoides e é naturalmente encontrado na *Myristica fragrans* (noz-moscada), *Cinnamomum verum* (canela) e *Allium sativum* (dente de alho) responsável pela aromatização dessas especiarias. Curiosamente, o próprio demonstrou uma atividade antibacteriana comparável até superior à sua isoforma altamente antimicrobiana o eugenol (HYLDGAARD, et al., 2015). É relatado na literatura que a uma maior resistência das bactérias Gram-negativas a ação desses fitoconstituinte em decorrência da complexa dupla membrana apresentada por estes micro-organismos em estudo a qual limita a difusão de compostos hidrofóbicos, através de sua cobertura lipopolissacarídica (BURT, 2004; HOLLEY; PATEL, 2005).

No estudo realizado por Caldas (2011) foi visto uma atividade antimicrobiana do eugenol frente a cepas ATCC de *P. aeruginosa* com uma CIM de 256 µg/mL que comparado com o presente estudo, a sua isoforma isoeugenol apresentou uma forte atividade com uma CIM de 64 µg/mL o que corrobora também com Hyldgaard e colaboradores dessa isoforma ser superior ao eugenol quando a atividade em questão é antimicrobiana.

Uma substância quando possui atividade antibacteriana, tem-se a natureza de ação bacteriostática ou bactericida, que pode ser obtida através do cálculo entre CBM/CIM. O efeito bactericida é considerado quando a razão entre CBM/CIM for ≤ 4 e bacteriostático quando esta for > 4 (SIDDIQUI et al., 2013). No presente estudo, foi possível determinar a sua CBM, pois todas as cepas foram sensíveis as concentrações estabelecidas no ensaio para a determinação e, no entanto, a natureza do isoeugenol pode ser caracterizada como sendo bactericida, o que traz assim uma relação bem parecida com o estudo de Hyldgaard et al., 2015 feito com bactérias Gram-negativas.

Silva e colaboradores (2015) mostram que óleo essencial de *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) que tem na sua constituição a presença do eugenol uma CBM > 1024 µg/mL frente a cepas clínicas de *P. aeruginosa* e isso corrobora para o estudo em questão que sua isoforma apresenta uma atividade bactericida melhor quando comparada a essa mesma atividade para com o eugenol.

Com relação a determinação da concentração inibitória mínima de antimicrobianos padrões, sendo estes, gentamicina e meropeném. A gentamicina

não apresentou resultados satisfatórios com uma CIM de 1024 µg/mL e uma CBM > 1024 µg/mL para todas as cepas de *P. aeruginosa*, enquanto que o meropeném trouxe um resultado bastante satisfatório com uma CIM e CBM de 32 µg/mL. Todas as bactérias foram capazes de crescer em caldo BHI sem adição do fitoconstituente, o que caracteriza a sua viabilidade. Da mesma forma um controle de esterilidade foi realizado para certificar que o caldo BHI utilizado nos ensaios não estivesse contaminado (Tabela 3 e tabela 4).

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da gentamicina frente às cepas ATCC e clínicas de *P. aeruginosa*.

Micro-organismo	Gentamicina		Controles	
	CIM	CBM(µg/mL)	Micro-organismo	Esterilidade
ATCC-9027	1024	>1024	+	-
ATCC-27853	1024	>1024	+	-
LM-136	1024	>1024	+	-
LM-163	1024	>1024	+	-
LM-230	1024	>1024	+	-
LM-286	1024	>1024	+	-
LM-297	1024	>1024	+	-
LM-356	1024	>1024	+	-
LM-359	1024	>1024	+	-
LM-362	1024	>1024	+	-
LM-375	1024	>1024	+	-
LM-410	1024	>1024	+	-

+: presença de crescimento do micro-organismo; -: ausência de crescimento de micro-organismo
 FONTE: Autor,2018.

Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do meropeném frente às cepas ATCC e clínicas de *P. aeruginosa*.

Micro-organismo	Meropeném		Controles	
	CIM	CBM(µg/mL)	Micro-organismo	Esterilidade
ATCC-9027	32	32	+	-
ATCC-27853	32	32	+	-
LM-136	32	32	+	-
LM-163	32	32	+	-
LM-230	32	32	+	-
LM-286	32	32	+	-
LM-297	32	32	+	-
LM-356	32	32	+	-
LM-359	32	32	+	-
LM-362	32	32	+	-
LM-375	32	32	+	-
LM-410	32	32	+	-

+: presença de crescimento do micro-organismo; -: ausência de crescimento de micro-organismo
 FONTE: Autor,2018.

Até a década de 1960, dentre os antimicrobianos existentes, a *P. aeruginosa* só se mostrava sensível à ação das polimixinas, sendo reconhecida por sua resistência natural às diferentes classes de antimicrobianos disponíveis. Posteriormente, com a descoberta de novas substâncias antimicrobianas, verificou-se a sensibilidade desta bactéria a alguns aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina, tobramicina e metilmicina), as carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, a algumas cefalosporinas de terceira geração sobretudo a ceftazidima, as cefalosporinas de quarta geração, aos carbapenéns, ao aztreonam e as fluoroquinolonas, especialmente o ciprofloxacino (HANCOCK, 1998).

Em um estudo realizado por Sader e colaboradores (2002) foi observado que frente a cepas clínicas de *P. aeruginosa* a inibição do crescimento das cepas bacterianas ao aminoglicosídeo em estudo foi inferior a 50%, o que corroboram com o estudo em questão, visto que frente ao aminoglicosídeo, gentamicina, a concentração inibitória do crescimento das cepas foi moderada obtendo um valor de CIM de apenas 1024 µg/mL.

Diferentemente, pôde-se observar que no estudo com a utilização de um carbapeném, meropeném, a CIM frente as cepas clínicas de *P. aeruginosa* foi de 32 µg/mL, considerado então uma ótima atividade de acordo com a classificação de SARTORATTO et al., 20004 (Quadro 2).

Essa confirmação pode ser vista no estudo realizado por SENTRY Antimicrobial Surveillance Program entre os anos 1997 e 2000, que determinou a frequência da ocorrência de infecção urinária e a sensibilidade aos antimicrobianos desses uropatógenos coletados na América Latina, sendo a *P. aeruginosa* o terceiro patógeno mais prevalente e o meropeném em estudo foi o composto mais ativo com uma CIM 2 µg/mL (SADER; GALES; JONES, 2003).

No estudo de Figueiredo e colaboradores (2007) a concentração inibitória frente as cepas clínicas de *P. aeruginosas* para com a gentamicina foi também inferior a 50%, o que mostra que o estudo também indica essa atividade moderada da gentamicina sobre essas cepas que possuem uma maior facilidade em desenvolver resistência aos antimicrobianos e confirma juntamente com o estudo a forte atividade do meropeném frente a essas cepas bacterianas.

Com esses resultados é visto que a gentamicina apresentou uma atividade bacteriostática frente as cepas clínicas de *P. aeruginosa*, enquanto que, o

meropeném realmente como é relatado na literatura tem uma excelente atividade sobre essas bactérias apresentando sua atividade bactericida principalmente quando essas cepas se encontram resistentes aos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (ZAVASCHI et al., 2010).

5.3 Ensaio de associação do fitoconstituente isoeugenol com antibacterianos-padrões através do método *checkerboard*

É relatado que vários estudos investigaram a associação de um antibiótico convencional com constituintes do OE com o intuito de determinar possíveis interações sinérgicas. Por exemplo, a combinação da vancomicina (antibiótico glicopéptido) e antibióticos β -lactâmicos com o eugenol resultaram num aumento da atividade por um fator de 5-1000 em relação aos seus valores das CIM individuais. Este efeito sinérgico pode ser explicado pelo fato do eugenol ser capaz de danificar a membrana de bactérias Gram-negativas, visto que uma concentração de 1 μ M deteriora cerca de 50% da membrana permitindo um aumento da penetração de vancomicina e antibióticos β -lactâmicos e, por conseguinte, maior efeito antimicrobiano (BATISTA, 2016).

A identificação de produtos naturais com atividade antibacteriana intrínseca ou a combinação com antimicrobianos de uso convencional podem representar uma promissora alternativa de tratamento, potencializá-los ou até mesmo trazer benefícios como a diminuição de reações adversas, diminuir a dose do fármaco e aumentar o espectro de ação (COUTINHO, 2008).

Juntamente com o ensaio de associação, foi feita a determinação da CIM onde permaneceu de 64 μ g/mL para o isoeugenol, 1024 μ g/mL para gentamicina e 32 μ g/mL para o meropeném. Estes resultados reforçam a atividade antibacteriana do isoeugenol demonstrada nos ensaios anteriores, visto que não ocorreu qualquer mudança significativa nos valores de CIM ao ser realizado este novo ensaio.

Os resultados das combinações entre o isoeugenol e a gentamicina contra cepas de *P. aeruginosa* ATCC-9027 e L.M 297 estão mostrados na Tabela 5 e 6, demonstrando assim que tanto a cepa ATCC, quanto a cepa L.M não cresceram em ambientes de concentração superior a CIM isolada de qualquer substância. Já com relação a concentração inferior a CIM isolada houve crescimento na cepa ATCC em

G (CIM/8)	-	-	-	-	-	-	+	+
H (CIM/16)	-	-	-	-	-	-	+	+

CIM: concentração inibitória mínima; +: presença de crescimento do micro-organismo; -: ausência de crescimento de micro-organismo. FONTE: Autor, 2018

Quadro 4: Determinação do ICIF da associação entre isoeugenol e gentamicina contra cepas de *P. aeruginosa*.

Cepas	CIF _A	CIF _B	ICIF	Tipo de Interação
	Isoeugenol	Gentamicina		
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC-9027)	0,1	0,2	0,3	Sinergismo
<i>P. aeruginosa</i> (L.M 297)	0,3	0,1	0,4	Sinergismo

CIF, Concentração Inibitória Fracionada; ICIF, Índice de Concentração Inibitória Fracionada

Nos resultados de combinações do isoeugenol e meropeném contra cepas de *P. aeruginosa* ATCC-9027 e L.M 297 que podem ser visualizados na Tabela 7 e 8 podemos observar que na cepa ATCC não houve crescimento em ambientes de concentração superior a CIM isolada de qualquer substância, enquanto que na cepa LM podemos ver esse crescimento acima da CIM isolada em CIMx2 para o meropeném. Porém na cepa ATCC houve crescimento na concentração inferior a CIM isolada em CIM/4 para o isoeugenol e CIM/2 para o meropeném, já com a cepa LM esse crescimento para o isoeugenol foi observado apenas na CIM/16.

Tabela 7: Efeito da associação do isoeugenol mais o meropeném em diferentes concentrações sobre cepas ATCC-9027 de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa - ATCC-9027

CIM Meropeném (Horizontal) X CIM Isoeugenol (Vertical)	1	2	3	4	5	6	7	8
	(CIMx8)	(CIMx4)	(CIMx2)	(CIM)	(CIM/2)	(CIM/4)	(CIM/8)	(CIM/16)
A (CIMx8)	-	-	-	-	-	-	-	-
B (CIMx4)	-	-	-	-	-	-	-	-
C (CIMx2)	-	-	-	-	-	-	-	-
D (CIM)	-	-	-	-	-	-	-	-
E (CIM/2)	-	-	-	-	-	+	+	+
F (CIM/4)	-	-	-	-	-	+	+	+
G (CIM/8)	-	-	-	-	-	+	+	+

H (CIM/16) | - - - - - + + +

CIM: concentração inibitória mínima; +: presença de crescimento do micro-organismo; -: ausência de crescimento de micro-organismo. FONTE: Autor, 2018

Tabela 8: Efeito da associação do isoeugenol mais o meropeném em diferentes concentrações sobre L.M 297 de *P. aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i> – L.M 297								
CIM Meropeném (Horizontal) X CIM Isoeugenol (Vertical)	1	2	3	4	5	6	7	8
	(CIMx8)	(CIMx4)	(CIMx2)	(CIM)	(CIM/2)	(CIM/4)	(CIM/8)	(CIM/16)
A (CIMx8)	-	-	-	-	-	-	-	-
B (CIMx4)	-	-	-	-	-	-	-	-
C (CIMx2)	-	-	-	-	-	-	-	+
D (CIM)	-	-	-	-	-	-	-	+
E (CIM/2)	-	-	-	-	-	-	-	+
F (CIM/4)	-	-	-	-	-	-	-	+
G (CIM/8)	-	-	-	-	-	-	-	+
H (CIM/16)	-	-	-	-	-	-	-	+

CIM: concentração inibitória mínima; +: presença de crescimento do micro-organismo; -: ausência de crescimento de micro-organismo. FONTE: Autor, 2018.

Quadro 5: Determinação do ICIF da associação entre isoeugenol e meropeném contra cepas de *P. aeruginosa*.

Cepas	CIF _A	CIF _B	ICIF	Tipo de Interação
	Isoeugenol	Meropeném		
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC-9027)	0,5	1	1,5	Indiferente
<i>P. aeruginosa</i> (L.M 297)	0,1	4	4,1	Antagonismo

CIF, Concentração Inibitória Fracionada; ICIF, Índice de Concentração Inibitória Fracionada

Morais e colaboradores (2015) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a associação entre a gentamicina e o extrato etanólico da samambaia *Lygodium venustum* utilizando o método de checkerboard verificou que quando testado sozinho, o extrato não mostrou qualquer atividade antibacteriana clinicamente relevante, no entanto, quando o extrato foi associado com gentamicina, houve um efeito aditivo ICIF= 0,5 para estirpes de bactérias Gram negativas e positivas. Esse resultado demonstra que *L. Venustum* pode ser uma fonte de

metabólitos que podem ser usados na terapia contra micro-organismos patogênicos com multirresistência a antibióticos em associação com antibióticos, como gentamicina.

Outros autores sugeriram que o eugenol, que tem como sua isoforma o isoeugenol, é potencialmente sinérgico com antibióticos contra bactérias Gram-negativas (Liu et al. 2015), o que também já corrobora com o estudo em questão por obter um sinergismo para com a gentamicina mas em contrapartida um antagonismo para o meropeném e isso nos leva a observar o estudo de Palaniappan e Holley (2010) que concluíram que o eugenol não interagiu com cinco dos seis antibióticos contra a espécie Gram-negativa, *E. coli*.

Apesar da compreensão limitada das interações de óleos essenciais-antibimicrobianos, Valcourt et al. (2016) estudaram nanocápsulas lipídicas como um potencial sistema de liberação de drogas para tais combinações. Não foram encontradas interações entre doxiciclina e carvacrol, eugenol ou cinamaldeído contra *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *A. baumannii* usando o método *checkerboard*.

Mesmo sendo escasso os dados que contribuem para a atividade antibacteriana do isoeugenol contra *P.aeruginosa* a respeito da terapia combinatória com outros antibacterianos, os resultados se mostram promissores, uma vez que a associação do fenilpropanoide a gentamicina apresentou sinergismo, o que seria um efeito desejável; como também os resultados corroboram com estudos anteriores que demonstram que a associação de gentamicina com produtos naturais resultou em resultados semelhantes ao do presente estudo, mas também pode-se observar que quando combinados o isoeugenol com o meropeném, essa atividade se torna indesejável trazendo um antagonismo, com tudo impedindo a atividade do antimicrobiano ao se associar ao fitoconstituente o isoeugenol.

Estes dados obtidos reforçam a importância do isoeugenol como potencial substância com ação antibacteriana, motivando o aprofundamento das pesquisas visando permitir sua inserção na terapêutica tradicional.

Conclusão

6 Conclusão

Com base nos estudos de atividade antibacteriana realizados com o fitoconstituente isoeugenol frente dez cepas clínicas de *P. aeruginosa* e duas cepas padrões ATCC pode-se concluir que:

O isoeugenol apresentou atividade antibacteriana contra cepas clínicas de *P. aeruginosa* com CIM de 64 µg/mL e a CBM de 128 µg/mL.

A associação do isoeugenol com a gentamicina apresentou efeito sinérgico para a cepas clínicas e ATCC, já para com o meropeném esse efeito apresentou indiferente para as cepas ATCC e antagonismo para as cepas clínicas.

Essas investigações feitas no estudo se mostram relevantes e torna-se necessário o aprofundamento do mesmo, uma vez que o caminho para descoberta de novos fármacos com atividade antimicrobiana veem sendo um ponto chave para combater a resistência desses micro-organismos e fazer o uso de produtos naturais, uma saída extraordinária como importância clínica e epidemiológica as infecções ocasionadas por *P. aeruginosa*.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALY, N. Y. A; AL-MOUSA, H. H; AL-ASAR, E. S. M. Nosocomial Infections in a MedicalSurgical Intensive Care Unit. **Medical Principles and Practice**, v. 17, p. 373–377, 2008.
- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, 2013.
- ANTUNES, R. M. P; LIMA, E. O; PEREIRA, M. S. V; CAMARA, C. A; ARRUDA, T. A; CATÃO, R. M. R; BARBOSA, T. P; NUNES, X. P; DIAS, C. S; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Volume 4, Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde, Brasília, 2013a.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 2, Série Controle Externo da Qualidade, Brasília, 2013b.
- APOLÓNIO, J; FALEIRO, M. L; MIGUEL, M. G; NETO, L. No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. **Microbiology Letters**, v. 354, p. 92-101, 2014.
- BAKKALI, F; AVERBECK, S; AVERBECK, D; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARSANTI, M. C; WOELTJE, K. Infection prevention in the intensive care unit. **Infections Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 703-725, 2009.
- BATISTA, D. S. B. Aplicações tradicionais e potencial bioativo de *Eugenia caryophyllata*: revisão bibliográfica. **Dissertação de Mestrado** - Universidade da Beira Interior, 2016.
- BERNARDO, S. P. C. Avaliação da Suscetibilidade a Antimicrobianos e Formação de Biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* Isoladas de água Mineral. **Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)**. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº2616, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 de maio de 1998. Seção I.
- BREIDENSTEIN, E. B; DE LA FUENTE-NUÑEZ, C; HANCOCK, R. E. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 419-426, 2011.
- BRUNING, M. C. R; MOSEGUI, G. B. G; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel

e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.17 n.10, p.2675-2685, 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

BURT, S.; Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. In *Journal food Microbiology* v. 94, n. 3, p. 223 -253, 2004.

BUSATO, N.V. et al. Modeling strategies for essential oil extraction by hydrodistillation and steam distillation. **Ciência Rural**, v.44, n.9, p.1574-1582, 2014.

CALDAS, F. R. L. Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais de folhas e inflorescências de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae). **Dissertação de Mestrado** Universidade Regional do Cariri – URCA, 2011.

CASTRO, R. D. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2010.

CHATTERJEE, S. S; OTTO, M. Improved understanding of factors driving methicillinresistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 205–217, 2013.

CLEELAND, R; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, p. 739-788, 1991.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard. 9th. ed.. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2012.

COSTA LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

COUTINHO, H. D; COSTA, J. G. M; LIMA, E. O; SILVA, V. S. F; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328-330, 2008.

CUNHA, A. P; ROQUE, O. R; NOGUEIRA, M. T. Plantas aromáticas e óleos essenciais – Composição e aplicações. **Fundação Calouste Gulbenkian**, 2012.

DUTTA, N. K; DASTIDAR, S. G; KUMAR, A; MAZUMDAR, K; RAY, R; CHAKRABARTY, A. N. Antimycobacterial activity of the antiinflammatory agent diclofenac sodium, and its synergism with streptomycin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 316-323, 2004.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011-2012. **Stockholm**, 2013.

ELIOPOULOS, G. M; MOELLERING, R. C. Antimicrobial combinations. In: Lorian. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, p. 434-441, 1991.

FERNADES, P. Antibacterial discovery and development-the failure of success? **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1497-1503, 2006.

FIQUEIREDO, E. A. P; RAMOS, H; MACIEL, M. A. V; VILAR, M. C. M; LOUREIRO, N. G; PEREIRA, R. G. Pseudomonas Aeruginosa: Frequency of Resistance to Multiple Drugs and Cross-Resistance between Antimicrobials in Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.19, n. 4, 2007.

FOLKESSON, A; LARS, J; YANG, L; HELLE, K. J; OANA, C; NIELS, H; SOREN, M. Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 841-851, 2012.

FREIRE, I. C. M; PÉREZ, A. L. A. L; CARDOSO, A. M. R; MARIZ, B. A. L. A; ALMEIDA, L. F. D; CAVALCANTI, Y. W; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre Streptococcus mutans e Staphylococcus aureus. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, 2014.

GELLATLY, S. L; HANCOCK, R. E. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013.

GOMILA, M.; GALLEGOS, M. C.; FERNÁNDEZ-BACA, V.; PAREJA, A.; PASCUAL, M.; DÍAZ-ANTOLIN, P.; GARCIA-VALDÉS, E.; LALUCAT, J. Genetic diversity of clinical Pseudomonas aeruginosa isolates in a public hospital in Spain. **BMC Microbiology**, v.13, p. 2-10, 2013.

HADACEK, F; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HAFIDH, R. R; ABDULAMIR, A. S; VERN, L. S; BAKAR, F. A; ABAS, F; JAHANSHIRI, F; SEKAWI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 98-106, 2011.

HAGAN, E. C; HANSEN, W. H; FITZHUGH, O. G; JENNER, P. M; JONES, W. I; TAYLOR, J. M. Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. **Food Cosmetics Toxicology**, v. 5, p. 141-157, 1967.

HAMMER, K. A; CARSON, C. F; RILEYA, T. V. Effects of Melaleuca alternifolia (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 909-015, 2012.

HANCOCK, R.E.W. Resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa and other nonfermentative gram-negative bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. S93-99, 1998

HOGARDT, M; HEESEMANN, J. Adaptation of Pseudomonas aeruginosa during persistence in the cystic fibrosis lung. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 557– 562, 2010.

HOLLEY, R. G.; PATEL, D.; Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, v. 22, p. 273-292, 2005.

HYDGAARD, M; MYGIND, T; PIOTROWSKA, R; FOSS, M; MEYER, R. L. Isoeugenol has a non-disruptive detergent-like mechanism of action. **Frontiers in Microbiology**, 2015.

ISO 9235. Aromatic natural raw materials — **Vocabulary**. **International Organization for Standardization**. 2013.

JARVIS, W.R. – Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, p. 344-351, 1987.

JUAN, N. C; OLIVER, A. Carbapenemases in *Pseudomonas* spp. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 1, p. 19-28, 2010.

KERR, K. G; SNELLING, A. M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and everpresent adversary. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, p. 338–344, 2009.

KIPNIS, E; SAWA, T; WIENER-KRONISH J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 36, p. 78-91, 2006.

KIPNIS, E; SAWA, T; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Medicine et Maladies Infectieuses**, v. 36, p. 78-91, 2006.

KLEPSEK, M. E; ERNST, E. J; LEWIS, R. E; ERNST, M.E; PFALLER, M. A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1207-1212, 1998.

KOLLEF, M. H. Gram-negative bacterial resistance: evolving patterns and treatment paradigms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 40, p. 85-88, 2005.

LABARCA, J. A; SALLES, M. J; SEAS, C; GUZMÁN-BLANCO M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 246-292, 2016.

LABAUVE, A. E; WARGO, M. J. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Current Protocols in Microbiology**, p. 1-8, 2012.

LISTER, P. D; WOLTER, D. J; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiological Reviews**, v. 22, n. 4, p. 582-610, 2009.

LISTER, P. D; WOLTER, D. J; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 4, p. 582–610, 2009.

LIU, Q; NIU, H; ZHANG, W; MU, H; SUN, C; DUAN, J. Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, p. 421–430, 2015.

LIVERMORE, D. M; WOODFORD, N. Carbapenemases: a problem in waiting? **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 489-495, 2000.

LONG, Q; HUANG, C; LIAO, P; XIE, J. Proteomic insights into *Acinetobacter baumannii* drug resistance and pathogenesis. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 23, n. 3, p. 227-55, 2013.

LOPES, G. F. G; PANTOJA, S. C. S. Levantamento das espécies de plantas medicinais utilizadas pela população de Santa Cruz – Rio de Janeiro- RJ, **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, ano 2013.

MARCHAIM, D; NANON-VENEZIA, S; SCHWARTZ, D; TARABEIA, J; FEFER, I; SCHWABER, M. J. Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1551-1555, 2007.

MARTINEZ, J. L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. Proceedings of the Royal Society. **Biological Sciences**, v. 276, p. 271-278, 2009.

MENA, K. D; GERBA, C. P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, 2009.

MICEK, S. T; WUNDERINK, R. G; KOLLEF, M. H; CHEN, C; RELLO, J; CHASTRE J; ANTONELLI, M. An international multicenter retrospective study of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: Impact of multidrug resistance. **Critical care**, v. 19, n. 1, p. 219, 2015.

MIYAMOTO, T; OKIMOTO, T; KUWANO, M. Chemical Composition of the Essential Oil of Mastic Gum and their Antibacterial Activity Against Drug-Resistant *Helicobacter pylori*. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 4, p. 227–231, 2014.

MOORE, N. M; FLAWS, M. L. Antimicrobial resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Laboratory Science Journal**, v. 24, n. 1, p. 47-50, 2011.

MORAIS-BRAGA, M. F. B; SOUZA, T. M; SANTOS, K. K. A; GUEDES, G. M. M; ANDRADE, J. C; TINTINO, S. R; SOBRAL-SOUZA, C. E; COSTA, J. G. M; SARAIVA, A. A. F; COUTINHO, H. D. M. Assitive effect of *Lygodium venustum* SW. in association with gentamic. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, 2015.

MORTEN, H; MYGIND, T; PIOTRWSKA, R; MORTEN F; RIKKE, L. Isoeugenol has a non-Disruptive Detergent-like Mechanism of Action . **Meyer Journal Name: Frontiers in Microbiology**, 2015.

MOUSSAOUI, F.; ALAOUI, T. Avaliação da atividade antibacteriana e efeito sinérgico entre o antibiótico e os óleos essenciais de algumas plantas medicinais. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 1, p. 32-37, 2016.

NASCIMENTO, G; LOCATELLI, J; FREITAS, P. C; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 247–256, 2000.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of isoeugenol (CAS No. 97-54-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). **National Toxicology Program Technical Report Series**, v. 551, p. 1–178, 2010.

National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. **Twelfth informational suplemente**, 7 ed, 2000.

National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility testing. **Twelfth informational suplement**, v. 22, n. 01, 2002.

NCUBE, N. S; AFOLAYAN, A. J; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797-1806, 2008.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

OLIVEIRA, A. C.; KOVNER, C. T.; SILVA, R. S. Nosocomial Infection in an Intensive Care Unit in a Brazilian University Hospital. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 18, n. 2, p. 233-239, 2010.

OLIVEIRA, A. C; PAULA, A. O; IQUIAPAZA, R. A; LACERDA, A. C. S. Infecções relacionadas à assistência em saúde e gravidade clínica em uma unidade de terapia intensiva. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 33, n. 3, p. 89-86, 2012.

OLIVEIRA, T. F. L; GOMES, F. I. S; PASSOS, J. S; CRUZ, S. S; OLIVEIRA, M. T; TRINDADE, S. C. Fatores associados à pneumonia nosocomial em indivíduos hospitalizados. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 6, p. 630-636, 2011.

OTT, E; SAATHOFF, S; GRAF, K; SCHWAB, F; CHABERNY, I. F. The Prevalence of Nosocomial and Community Acquired Infections in a University Hospital. An Observational Study. **Archive of Deutsches Ärzteblatt International**, v. 110, p. 31-32, 2013.

PALANIAPPAN, K; HOLLEY. R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 164–168, 2010.

PEDROSA, A. P. et al. Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 9, n. 2, p. 313-324, 2014.

PRADEEPA, S; SUBRAMANIAN, S; KAVIYARASAN, V. Evaluation of antimicrobial activity of *Pithecellobium Dulce* pod pulp extract. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, p. 32-37, 2014.

RAUT, J. S; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

SADER, H. S; GALES, A. C; JONES, R. N. Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results of SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, p. 301-311, 2003.

SADER, H. S; GALES, A. C; JONES, R. N. Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, p. 289-299, 2002.

SADIKOT, R. T; BLACKWELL, T. S; CHRISTMAN, J. W; PRINCE, A. S. Pathogen-host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, p. 1209-1223, 2005.

SARTO, M. P. M; ZANUSSO JUNIOR, G. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista Uninga**, v. 20, n. 1, p. 98-102, 2014.

SEMENIUC, C.A. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 2, p. 403-408, 2017.

SHAIKH, S. Prevalence of multidrug resistant and extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, p. 62-64, 2015.

SIDDIQUI, Z. N; FAROOQ, F; MUSTHAF, T. N. M; AHNMAD, A; KHAN, A. U; Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237 – 243, 2013.

SILVA, V. A; SOUSA, J. P; PESSÔA, H. L. F; PAULA, A. F. R; COUTINHO, H. D. M; ALVES, L. B. N; LIMA, E. O. *Ocimum basilicum*: Antibacterial activity and association study with antibiotics against bacteria of clinical importance. **Pharmaceutical Biology**, 2015.

SILVEIRA, S.M. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (*Lavandula angustifolia*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 462-470, 2012.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P; GOSMANN, G; MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre: **Edição da UFRGS**, p.1104, 2007

SMITH, E. E; BUCKLEY, D. G; WU, Z; SAENPHIMMACHAK, C; HOFFMAN, L. R; D'ARGENIO, D. A; MILLER, S. I; RAMSEY, B. W; SPEERT, D. P; MOSKOWITZ, S. M; BURNS, J. L; KAUL, R; OLSON, M. V. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 8487–8492, 2006.

SOMMER, R; JOACHIM, I; WAGNER, S; TITZ, A. New approaches to control infections: anti-biofilm strategies against gram-negative bacteria. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 286-290, 2013.

SOUSA, E. O; BARRETO, F. S; RODRIGUES, F. F. G; COSTA, J. G. M. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* L.e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. na resistência de aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, p. 1-5, 2010.

SPENCER, R C. Predominant pathogens found in the european prevalence of infection in intensive care study. **Journal Clinical Microbiological Infectious Diseases**, v. 15, n. 15, p. 281–285, 1996.

STRATEVA, T; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1133-1148, 2009.

STRATEVA, T; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Journal Medical Microbiological**, v. 58, n. 9, p. 1133-1148, 2009.

TAYLOR, J. M; JENNER, P. M; JONES, W. I. A comparison of the toxicity of some allyl, propenyl, and propyl compounds in the rat. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 6, p. 378–387, 1964.

TSTSOPOULOS, P. P; LOSIFIDIS, E; ANTACHOPOULOS, C; ANESTIS, D. M; KARANTANI, E; KARYOTI, A; PAPAEVANGELOU, G; KYRIAZIDIS, E; ROILIDES, E; TSONIDIS, C. Nosocomial bloodstream infections in neurosurgery: a 10-year analysis in a center with high antimicrobial drug-resistance prevalence. **Acta Neurochirurgica**, 2016.

VALCOURT, C; SAULNIER, P; UMERSKA, A; ZANELLI, M. P; MONTAGU, A; ROSSINES, E; JOLY-GUILLOU, M. L. Synergistic interactions between doxycycline and terpenic components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against Gram negative bacteria. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 498, p. 23–31, 2016.

WAWRZYNIAK, K; MIKUCHA, A; DEPULA, A; GOSPODAREK, E; KUSZA, A. Occurrence of alert pathogens in the clinical materials and consumptions of antibiotics in the ICU, in the years 2007 and 2008. **Critical Care**, v. 14, n. 1, p. 53, 2010.

YIM, H; WOO, H; SONG, W; PARK, M. J; KIM, H. S; LEE, K. M; HURK, J; PARK, M. S. Time-kill synergy tests of tigecycline combined with imipenem, amikacin and ciprofloxacin againsts clinical isolates of multidrugs-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 41, n. 1, p. 39-43, 2011.

ZAVASCHI, A. P; CARVALHAES, C. G; PICÃO, R. C; GALES, A. C. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 1, p. 71-93, 2010.

ZHANG, L. L; ZHANG, L. F; XU, JIAN-GUO; HU, Q. P. Comparison study on antioxidant, DNA damage protective and antibacterial activities of eugenol and isoeugenol against several foodborne pathogens. **Food & Nutrition Research**, v. 61, 2017.

Anexo

